

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-180819

(43)Date of publication of application : 02.07.2003

(51)Int.Cl.

A61L 27/00
C12N 5/06

(21)Application number : 2001-384446

(71)Applicant : OCHI MITSUO
JAPAN TISSUE ENGINEERING:KK

(22)Date of filing : 18.12.2001

(72)Inventor : OCHI MITSUO
SUGAWARA KATSURA

(54) MATERIAL FOR TRANSPLANT AND CELLULAR RETENTION CARRIER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a material for transplant which can be engrafted at an early stage after transplant by having physical properties and shapes similar to a transplant site. SOLUTION: The meniscus of a donor is extracted and frozen and cryopreserved aseptically at -80° C. Just before utilizing this as the cellular retention carrier, the frozen meniscus is thawed and thereafter, multiple pores are formed so as to wet cells by using a needle-shaped implement. The meniscus formed with the pores is used as the cellular retention carrier. A cell suspension is prepared by using marrow cells obtained from the tibia of a recipient and dripped to the cellular retention carrier to be wet and engrafted inside the cellular retention carrier to be cultured. Thus, the cells are proliferated and a substrate is produced to create a material for transplant. When this material for transplant is transplanted to the recipient, it is engrafted in a short period.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-180819
(P2003-180819A)

(43) 公開日 平成15年7月2日(2003.7.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード(参考)
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	V 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2001-384446(P2001-384446)

(22) 出願日 平成13年12月18日(2001.12.18)

(71) 出願人 599170434

越智 光夫

広島県広島市安佐南区山本2-11-3

(71) 出願人 399051858

株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1

(72) 発明者 越智 光夫

広島県広島市安佐南区山本2-11-3

(74) 代理人 110000017

特許業務法人アイテック国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植用材料及び細胞保持担体

(57) 【要約】

【課題】 移植部位と同等の物性・形状を有し移植後早期に生着させることができる。

【解決手段】 ドナーの半月板を摘出し、無菌的に-80℃で凍結保存した。これを細胞保持担体として利用する直前に、凍結半月板を解凍した後、針状の治具を用いて細胞が湿潤しやすいように多孔を形成し、これを細胞保持担体とした。レシピエントの脛骨から得た骨髓細胞を用いて細胞懸濁液を調製し、この細胞懸濁液を先の細胞保持担体に滴下して細胞保持担体内部へ湿潤・生着させ培養することにより、細胞を増殖させると共に基質を産生させて移植用材料を作製した。この移植用材料をレシピエントに移植したところ、短期間で生着した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 所定の移植部位へ移植する移植用材料であって、
体組織から入手した前記所定の移植部位と同種の組織構造物に該組織構造物の形状を維持したまま抗原性抑制処理を施して得た細胞保持担体に、前記所定の移植部位に応じた細胞が保持された移植用材料。

【請求項2】 前記体組織は、死体由来の組織である請求項1記載の移植用材料。

【請求項3】 前記組織構造物は、骨、半月板、靱帯、
腱、神経又は硝子軟骨である請求項1又は2記載の移植用材料。

【請求項4】 前記抗原性抑制処理は、凍結処理又は加熱処理である請求項1～3のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項5】 前記細胞保持担体は、孔を多数有する請求項1～4のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項6】 前記細胞保持担体は、孔径50～500 μm の孔を多数有する請求項5記載の移植用材料。

【請求項7】 前記細胞は、移植先の患者自身の自家細胞である請求項1～6のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項8】 前記細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞及びこれらの前駆細胞並びに間葉系幹細胞からなる群より選ばれた少なくとも1つである請求項1～7のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項9】 前記細胞保持担体には、前記所定の移植部位に応じた細胞と該細胞が産生した基質とが保持されている請求項1～8のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項10】 所定の移植部位へ移植する移植用材料の一部をなす細胞保持担体であって、
体組織から入手した前記所定の移植部位と同種の組織構造物に該組織構造物の形状を維持したまま抗原性抑制処理を施して得た細胞保持担体。

【請求項11】 前記組織構造物は、死体組織から入手したものである請求項10記載の細胞保持担体。

【請求項12】 前記組織構造物は、骨、半月板、靱帯、腱、神経又は硝子軟骨である請求項10又は11記載の細胞保持担体。

【請求項13】 前記抗原性抑制処理は、凍結処理又は加熱処理である請求項10～12のいずれかに記載の細胞保持担体。

【請求項14】 孔を多数有する請求項10～13のいずれかに記載の細胞保持担体。

【請求項15】 孔径50～500 μm の孔を多数有する請求項14記載の細胞保持担体。

【請求項16】 生体外で細胞を培養する担体として使用する請求項10～15のいずれかに記載の細胞保持担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、所定の移植部位へ移植する移植用材料及びその移植用材料の一部をなす細胞保持担体に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、細胞培養技術の進歩により、ポリマー等の高分子材料で作製された担体（Scaffold）に細胞を播種した移植用材料が作製可能となっている。このような移植用材料としては、例えば、生体外（in vitro）での培養処理によって、細胞を増殖させたり、タンパク質や多糖類などの基質を産生させて細胞外マトリクスを形成させたりした後に移植する形態のものや、あるいは移植後の生体内（in vivo）で担体を足場として細胞を増殖させることによって、治療を可能とする形態のものが案出されている。

【0003】一方、米国などでは死体から得られる組織が、そのまま移植用材料として利用されている。この場合、患者自身の細胞が、遊走、湿潤し、やがて生着することにより、患部が治癒される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、高分子材料等の人工材料で作製した担体では、移植先の組織と同等の物性・形状を有するものを作製することは困難である。例えば、半月板に人工材料を適用した際には、関節軟骨の変性、繊維化組織の増生、炎症等の症状が観察された、との報告とともに、コラーゲン等の生体材料でも同様であった旨、報告されている（M. A. Sweigart et al, Tissue Engineering 7 (2), pp111-129 (2001)）。このように、半月板等では、生体適合性が良く、使用に耐え得る移植用材料の開発には、未だ至っていないのが現状である。

【0005】一方、死体組織をそのまま利用した移植用材料では、物性的な問題は存在しないが、移植後から細胞の生着までには時間がかかるため、治癒までに時間がかかるという問題を抱えている。

【0006】本発明は上記問題点に鑑みなされたものであり、移植部位と同等の物性・形状を有し移植後早期に生着させることのできる移植用材料を提供することを目的の一つとする。また、この移植用材料の一部をなす細胞保持担体を提供することを目的の一つとする。

【0007】

【課題を解決するための手段、発明の実施の形態及び発明の効果】上記目的の少なくとも一つを解決するため、下記の発明を完成するに至った。

【0008】本発明の第1は、所定の移植部位へ移植する移植用材料であって、体組織から入手した前記所定の移植部位と同種の組織構造物に該組織構造物の形状を維持したまま抗原性抑制処理を施して得た細胞保持担体に、前記所定の移植部位に応じた細胞が保持されたものである。

【0009】この移植用材料では、体組織から入手した所定の移植部位と同種の組織構造物を細胞保持担体として利用しているため、移植部位と同等の物性・形状を有している。また、組織構造物に抗原抑制処理が施されているため、移植後に拒絶反応が起こりにくい。更に、移植先に応じた細胞を保持しているため、移植後細胞が早期に生着しやすい。したがって、この移植用材料によれば、移植部位と同等の物性・形状を有し移植後早期に生着させることができる。

【0010】なお、「所定の移植部位に応じた細胞」とは、所定の移植部位に存在する細胞と同様の細胞のほか、所定の移植部位に存在する細胞になり得る細胞（例えばES細胞や間葉系細胞等）も含む意である。

【0011】この移植用材料において、前記組織構造物は、死体組織から入手したものであることが好ましい。この場合、組織構造物を生体組織から入手する場合に比べて入手しやすい。また、移植先が人間であれば、人間の死体組織か、その移植先の物性・形状が人間に似ている動物の死体組織から組織構造物を入手するのが好ましい。

【0012】この移植用材料において、前記組織構造物は、細胞外マトリクスによって組織構造体を構成しているものであることが好ましく、骨、半月板、靱帯、腱、神経又は硝子軟骨であることがより好ましく、半月板、靱帯又は硝子軟骨であることが特に好ましい。これらの部位は高分子材料等の人工材料での作製が困難であるので、本発明を適用する意義が大きい。

【0013】この移植用材料において、前記抗原性抑制処理としては、凍結処理、加熱処理などが挙げられるが、対象となる組織構造物の種類に応じて使い分けることが好ましい。例えば、半月板や靱帯の場合、凍結処理が好ましく、骨の場合は、加熱処理が好ましい。この場合、体組織から入手した組織構造物に細胞が付着していたとしても、これらの処理により死滅させることができるため、容易に抗原性を抑制できる。

【0014】この移植用材料において、前記細胞保持担体は、孔を多数有していることが好ましく、その孔径は50～500 μm 、特に80～200 μm であることが好ましい。この細胞保持担体に細胞を保持させる際に細胞懸濁液を利用する場合には、細胞保持担体が多数の孔を有していた方が湿潤しやすく、細胞培養を良好に行うことができる。また、多孔率が高過ぎる場合や、孔が大き過ぎる場合には、細胞保持担体の機械的強度が失われる可能性がある為、これを考慮して設定することが好ましい。

【0015】この移植用材料において、前記細胞は、移植先の患者自身の自家細胞であることが好ましい。この場合、移植を受けた患者に拒絶反応が起きにくい為、早期に細胞が生着する。

【0016】この移植用材料において、前記細胞は、骨

芽細胞、軟骨細胞、筋細胞及びこれらの前駆細胞並びに間葉系幹細胞からなる群より選ばれた少なくとも1つであることが好ましい。これらの細胞は、細胞外マトリクスを形成する基質を多く産生して組織構造体を形成する細胞又はその前駆細胞であるので、本発明を適用するのに相応しい。

【0017】この移植用材料において、前記細胞保持担体には、前記所定の移植部位に応じた細胞と該細胞が産生した基質とが保持されていることが好ましい。この場合、移植先に応じた細胞のほか、その細胞が産生した基質も保持しているため、移植後細胞が一層早期に生着しやすい。なお、このような基質を細胞保持担体に保持するには、例えば、細胞保持担体に細胞を播種又は保持したあとこの細胞を培養すればよい。

【0018】また、上記移植用材料を作製する方法としては、体組織から入手した前記所定の移植部位と同種の組織構造物に該組織構造物の形状を維持したまま抗原性抑制処理を施して得た細胞保持担体に、前記所定の移植部位に応じた細胞を保持させることにより移植用材料を得るものである。この製法によれば、移植部位と同等の物性・形状を有し移植後早期に生着させることができる移植用材料を作製できる。この製法において、前記組織構造物は、死体組織から入手したものであることが好ましく、また、骨、半月板、靱帯、腱、神経又は硝子軟骨であることが好ましく、半月板、靱帯又は硝子軟骨であることが特に好ましい。また、前記抗原性抑制処理としては、凍結処理、加熱処理などが挙げられるが、対象となる組織構造物の種類に応じて使い分けことが好ましい。例えば、半月板や靱帯の場合、凍結処理が好ましく、骨の場合は、加熱処理が好ましい。更に、前記細胞保持担体は、孔を多数有していることが好ましく、その孔径は50～500 μm 、特に80～200 μm であることが好ましい。更にまた、前記細胞は、移植先の患者自身の自家細胞であることが好ましく、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞及びこれらの前駆細胞並びに間葉系幹細胞からなる群より選ばれた少なくとも1つであることが好ましい。そしてまた、前記細胞保持担体には、前記所定の移植部位に応じた細胞と該細胞が産生した基質とを保持させることが好ましい。なお、これらが好ましい理由については、既に述べた通りであるが、例えば、細胞保持担体に細胞を播種又は保持させた後、培養工程を設けることで、細胞を増殖させると共に基質を産生させ、細胞保持担体に保持させることができる。また、培養工程に併せて、分化誘導工程を設けることで、各前駆細胞や間葉系幹細胞を所望の細胞に分化させ、基質を産生させることも可能である。

【0019】本発明の第2は、所定の移植部位へ移植する移植用材料の一部をなす細胞保持担体であって、体組織から入手した前記所定の移植部位と同種の組織構造物に該組織構造物の形状を維持したまま抗原性抑制処理を

施して得たものである。この細胞保持担体では、体組織から入手した所定の移植部位と同種の組織構造物を利用しているため、移植部位と同等の物性・形状を有している。また、抗原抑制処理が施されているため、移植後に拒絶反応が起こりにくく生着率が高い。したがって、この細胞保持担体によれば、移植用材料のうち細胞を保持させる足場として用いるのに適している。

【0020】この細胞保持担体において、前記組織構造物は、死体組織から入手したものであることが好ましい。この場合、組織構造物を生体組織から入手する場合に比べて入手しやすい。また、移植先が人間であれば、人間の死体組織か、その移植先の物性・形状が人間に似ている動物の死体組織から組織構造物を入手するのが好ましい。

【0021】この細胞保持担体において、前記組織構造物は、細胞外マトリクスによって組織構造体を構成しているものであることが好ましく、骨、半月板、靱帯、腱、神経又は硝子軟骨であることがより好ましく、半月板、靱帯又は硝子軟骨であることが特に好ましい。これらの部位は高分子材料等の人工材料での作製が困難であるので、本発明を適用する意義が大きい。

【0022】この細胞保持担体において、前記抗原性抑制処理は、凍結処理、加熱処理などが挙げられるが、対象となる組織構造物の種類に応じて使い分けることが好ましい。例えば、半月板や靱帯の場合、凍結処理が好ましく、骨の場合は、加熱処理が好ましい。この場合、体組織から入手した組織構造物に細胞が付着していたとしても、これらの処理により死滅させることができるため、容易に抗原性を抑制できる。

【0023】この細胞保持担体は、孔を多数有していることが好ましく、その孔径は50～500 μ m、特に80～200 μ mであることが好ましい。この細胞保持担体は、細胞培養時に使用されるものであるが、その細胞培養時には通常、細胞懸濁液を細胞保持担体に湿潤させるため、多数の孔を有していた方が湿潤しやすい。なお、組織構造物に多数の孔をあけるのは、抗原性抑制処理の前又は後のいずれであってもよい。

【0024】この細胞保持担体は、生体外で細胞を培養する担体として使用することが好ましい。この場合、この細胞保持担体には細胞が増殖すると共にその細胞によって基質が産生される。

【0025】また、上記移植用材料の一部をなす細胞保持担体を作製する方法としては、体組織から入手した前記所定の移植部位と同種の組織構造物に該組織構造物の形状を維持したまま抗原性抑制処理を施すことにより細胞保持担体を得るものである。この製法によれば、移植用材料のうち細胞を保持させる足場として用いるのに適した細胞保持担体を作製できる。この製法において、前記組織構造物は、死体組織から入手したものであることが好ましく、また、骨、半月板、靱帯、腱、神経又は硝

子軟骨であることが好ましく、半月板、靱帯又は硝子軟骨であることが特に好ましい。また、前記抗原性抑制処理としては、凍結処理、加熱処理などが挙げられるが、対象となる組織構造物の種類に応じて使い分けることが好ましい。例えば、半月板や靱帯の場合、凍結処理が好ましく、骨の場合は、加熱処理が好ましい。更に、前記組織構造物は、抗原性抑制処理の前又は後に多数の孔をあけることが好ましく、その孔径は50～500 μ m、特に80～200 μ mであることが好ましい。更にまた、前記細胞は、移植先の患者自身の自家細胞であることが好ましく、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞及びこれらの前駆細胞並びに間葉系幹細胞からなる群より選ばれた少なくとも1つであることが好ましい。そしてまた、前記細胞保持担体には、生体外で細胞を培養する担体として使用することが好ましい。なお、これらが好ましい理由については、既に述べた通りである。

【0026】

【実施例】〔実施例1〕細胞保持担体の作製

提供側（ドナー）となる日本白色家兎成獣の半月板を摘出し、無菌的に－80℃で凍結保存した。この凍結保存処理により、半月板のドナー細胞を死滅させ、免疫抗原性を消失させることで、半月板の構造組織のみを残すことができた。この凍結保存した半月板を使用する直前に解凍した後、針状の治具を用いて細胞が湿潤しやすいように孔径がおよそ80～200 μ mの多孔をあけることにより、細胞保持担体とした。

【0027】〔実施例2〕移植用材料の作製

移植を受ける側（レシピエント）の日本白色家兎の脛骨から、ヘパリンを少量含むシリンジで吸引することで骨髓細胞を得た。これを10% v/v FBS（ウシ胎児血清）を含有するDMEM（ダルベッコ変法イーグル培地）で10倍に希釈し、細胞懸濁液を調製した。このときのDMEMには抗生物質を添加したものを使用した。この骨髓細胞を2週間培養すると培養容器底面に接着する間葉系幹細胞が増殖してくるので、この細胞をトリプシン処理により容器底面より剥離し、 1×10^6 個/m¹の濃度の細胞懸濁液を得た。これを実施例1で得た細胞保持担体に滴下して細胞保持担体内部へ湿潤・生着させ、37℃、5% CO₂下で1週間培養することにより、細胞を増殖させると共に基質を産生させて組織構造化した移植用材料（細胞保持担体に自家細胞を保持した移植用材料）を作製した。培地には、10% v/v FBS含有DMEMを使用し、1週間後に培地を除去した。

【0028】なお、比較例として、実施例1で凍結保存した半月板を37℃で解凍した後、細胞懸濁液を播種せずに前記液体培地中で1週間置いたものを作製した。以下これを比較例の移植用材料という。

【0029】〔実施例3〕移植実験

レシピエントの日本白色家兎の関節包を開創した後、内側半月板を全切除した。実施例2で得た移植用材料と比

較例の移植用材料細胞の各々において、前角と後角に縫合糸を通し、脛骨の解剖学的付着部に縫合した。移植後はギプス固定を 4 週間行い、4, 8, 12 週目に組織学的検査を行った。その検査の結果、4 週目において、実施例 2 で得た移植用材料を移植した群では既に半月板内部に細胞が存在していたのに対して、比較例の移植用材料を移植した群では縫合境界部に周辺からの侵入がわずかに見られるのみであった。また、実施例 2 で得た移植用材料を移植した群では、8 週目で内部に軟骨細胞及び

軟骨細胞が作ったと思われる細胞外マトリクスが観察されたのに対して、比較例の移植用材料を移植した群では、12 週目でようやく半月板内部に軟骨細胞及び細胞外マトリクスが観察された。

【0030】なお、本発明は上記実施例に何等限定されるものではなく、本発明の技術的範囲を逸脱しない範囲内において、種々なる形態で実施し得ることは勿論である。

フロントページの続き

(72)発明者 菅原 桂
島根県出雲市白枝町562-7 アドニス101

F ターム(参考) 4B065 AA90X BC41 CA44
4C081 AB02 AB05 AB18 BA12 CD34
DA01 DB03 DB06